

北森 武彦

東京大学大学院工学系研究科  
教授

## 拡張ナノ流体デバイス工学によるピコ・フェムトリットル蛋白分子プロセッシング

### § 1. 研究成果の概要

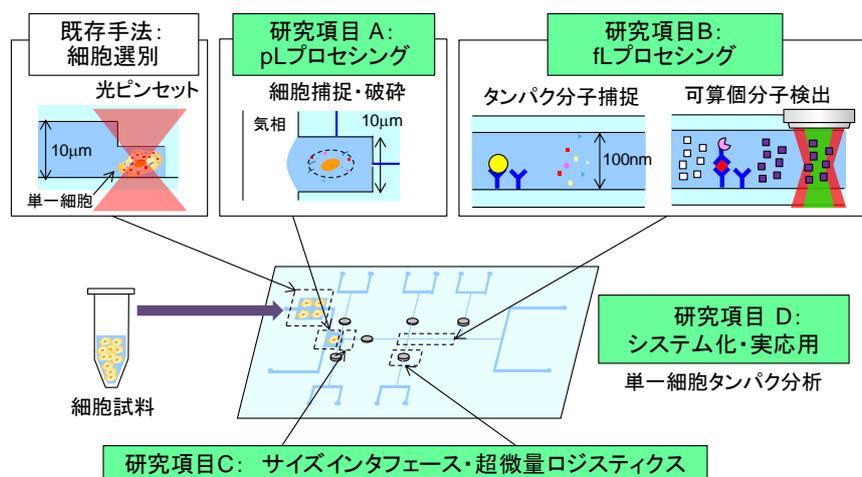


図 本研究の目標

現在単一細胞分析の方法論・機器開発における最も大きな課題は、人(ユーザー)から単一細胞だけではなく、少数分子に至るまで6桁に及ぶサイズ階層の乖離と、極微小空間における化学プロセッシングや超高感度検出の困難さである。本研究では、図に示すように、細胞プロセッシング(pL)／分子プロセッシング(fL)を、研究代表者ら独自の方法論であるマイクロ流体デバイス／拡張ナノ流体デバイスにより実現して、乖離しているサイズ階層を接続するサイズインターフェース、さらには極微小空間で分取試料を輸送するための超微量ロジスティクスを開発する。これらをシステム化して化学的増幅が困難なタンパクに対して 1 細胞レベルの極限分析デバイスを実現し、単一細胞研究に実応用することを目的としている。

2018年度は、研究期間前半の目的である単一細胞タンパク分析の要素技術開発(研究項目 A、B、C)について当初目的をほぼ達成し、さらに研究を進める中で新たに生じた課題に取り組んだ。また、当初計画より1年早く昨年度から着手しているシステム化・実用化(研究項目 D)については、前年度に引き続き本年度も研究を推進した。その結果、pL の細胞プロセッシングから fL の分子プロセッシングまで全てを統合集積化した単一生細胞タンパク分析デバイスを用い、単一 B 細胞が刺激に応答して産生するサイトカイン IL-6 を定量することに成功した。これにより、単一生細胞タンパク分析を世界ではじめて実現するなど、当初計画を上回る特筆すべき成果を得た。以下、各項目について述べる。

研究項目 A では、表面に構築した数 $\mu\text{m}$  のピン構造と流路表面の親水/疎水の塗り分けにより液体の濡れによる試料流出を防止しつつ、タンパクの吸着を抑制可能な pL チャンバーを開発した。これにより、単一細胞が分泌したタンパク分子を逃さずに分析用の拡張ナノ流路に導入することを可能にした。

研究項目 B では、拡張ナノ空間を利用した可算個分子レベルの ELISA で問題となる目的分子のロスという問題を解決した。洗浄プロセスにおける目的分子の解離がロスの原因となることを見出し、洗浄に要する時間を短縮可能なデバイスの開発によって目的分子のロスを抑制し、拡張ナノ ELISA の性能向上を達成した。

研究項目 C では、前年度に開発した数 100  $\mu\text{m}$  のガラス基板上に作製したガラスの微小変形を利用した拡張ナノ流路開閉バルブの性能評価およびバルブを用いた流体操作を検証し、fL オーダーでの流れの切り替えや流量調整に成功した。これにより、多数の試薬の切り替えが求められる単一細胞タンパク分析デバイスへの応用が可能となり、流体操作の自動化や分析の精度向上に貢献する。

研究項目 D では、fL-pL の極限化学プロセッシングを統合集積化した単一細胞タンパク分析デバイスを開発した。多数のマイクロ・拡張ナノ流路で構成され集積回路のように複雑化したデバイスを用い、単一 B 細胞が刺激に応答して産生するサイトカイン IL-6 を定量することに成功した。これにより、単一生細胞タンパク分析を世界ではじめて実現した。また、拡張ナノ液体クロマトグラフ質量分析計の開発について追加支援をいただき、拡張ナノグラジエントクロマトグラフィーによって細胞のタンパク試料を体積 fL で分離することに成功し、これを質量分析計へと 100%導入するための fL 液滴生成に成功した。

#### 【代表的な原著論文】

1. T. Nakao, Y. Kazoe, K. Morikawa, A. Yoshizaki, K. Mawatari, T. Kitamori, "Micro/nano-integrated fluidic device for living single-cell protein analysis", *Proceedings of MicroTAS2018*, pp.132-134, 2018.
2. Y. Kazoe, Y. Pihosh, H. Takahashi, T. Ohyama, H. Sano, K. Morikawa, K. Mawatari, T. Kitamori, "Femtoliter nanofluidic valve utilizing glass deformation", *Lab on a Chip*, 19, pp.1686-1694, 2019.
3. H. Shimizu, K. Tokyoda, K. Mawatari, S. Terabe, T. Kitamori, "Femtoliter Gradient Elution System for Liquid Chromatography Utilizing Extended-Nano Fluidics", *Analytical Chemistry*, 91, pp.3009-3014, 2019

## § 2. 研究実施体制

### (1)「デバイス開発」グループ

- ① 研究代表者:北森 武彦 (東京大学大学院工学系研究科、教授)
- ② 研究項目
  - ・ pL 空間を用いた細胞プロセッシング法、fL 空間を用いた分子プロセッシング法、サイズインターフェース・超微量ロジスティクスなど、要素技術の開発
  - ・ 単一細胞タンパク分析システムの開発
  - ・ 研究全体の統括

### (2)「化学プロセス設計」グループ

- ① 主たる共同研究者:蓑田 亜希子 (理化学研究所生命医科学研究センター、ユニットリーダー)
- ② 研究項目
  - ・ 単一細胞タンパク分析の化学プロセスの設計
  - ・ pL 空間を用いた単一細胞捕捉、細胞膜破碎・核破碎の検証
  - ・ fL 空間を用いた目的タンパク分子捕捉の検証

### (3)「デバイス実応用」グループ

- ① 主たる共同研究者:吉崎 歩 (東京大学医学部附属病院、講師)
- ② 研究項目
  - ・ 単一細胞タンパク分析システムの実応用
  - ・ 自己反応性 B 細胞の機能解明